

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20241108.003

网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241108.1520.006>

外泌体滴鼻对抑郁小鼠行为的影响及单胺类递质释放水平的改变观察

田梦思¹, 郑育杰¹, 沈雅婷¹, 郭青云^{1,2}, 易西南^{1,2}✉

(1. 海南医科大学基础医学与生命科学学院, 热带转化医学教育部重点实验室和海南省热带脑科学研究与转化重点实验室, 海口 571199; 2. 海南医科大学解剖学教研室, 海口 571199)

[摘要] **目的:** 探讨脂肪间充质干细胞外泌体(ADMSCs-EXO)滴鼻对小鼠抑郁行为的影响及其基本作用机制。**方法:** 采用慢性束缚应激法建立抑郁模型, 分别施加 EXO 或 PBS, 每日 1 次持续 8 周, 正常对照组小鼠不造模。采用悬尾、强迫游泳实验评估抑郁行为。免疫荧光观测 PKH26 标记的 EXO 入脑路径。再次行为学测试后, ELISA 实验检测海马单胺类递质变化。**结果:** EXO 滴鼻后 72 h 内, EXO 达海马等脑区。给药 8 周后, CMS+EXO 组小鼠抑郁行为显著改善, 具有统计学意义 ($P<0.05$), 且海马 5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素含量显著增加, 具有统计学意义 ($P<0.01$)。**结论:** ADMSCs-EXO 滴鼻可改善小鼠抑郁行为, 提升单胺类递质含量。EXO 滴鼻可能成为治疗抑郁症的新策略。

[关键词] 脂肪间充质干细胞; 外泌体; 抑郁; 行为; 小鼠; 单胺类神经递质

[中图分类号] R749.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2025)15-1121-09

Observation of the effects of exosome intranasal administration on the behavior of depressed mice and changes in monoamine neurotransmitter release levels

TIAN Mengsi¹, ZHENG Yujie¹, SHEN Yating¹, GUO Qingyun^{1,2}, YI Xinan^{1,2}✉

(1. Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education & Key Laboratory of Brain Science Research Transformation in Tropical Environment of Hainan Province, School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 2. Department of Anatomy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Foundation Project]: This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82301632), Social Development Project of Hainan Provincial Department of Science and Technology (ZDYF2024SHFZ137, ZDYF2020145), Open Project Fund of The Key Laboratory of Brain Science Research and Transformation in Tropical Environment of Hainan Province (2022001), and Graduate Innovation Program of Hainan Medical University (HYYB2022A15)

[Author]: TIAN Mengsi, E-mail: 13119683@qq.com.

[Correspondence to]: YI Xinan, Ph.D., Professor, Doctoral Supervisor, E-mail: YiXN001@163.com.

Received: 2024-08-17

Revised: 2024-11-03

JHMU, 2025;31(15):1121-1129

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of intranasal administration of adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes (ADMSCs-EXO) on depressive behaviors in mice and its underlying mechanisms. **Methods:** Chronic binding stress was used to develop depression models, with EXO or PBS applied once daily for 8 weeks, and normal control mice were not treated. The depressive behavior was assessed using the suspended tail and forced swim experiment. Immunofluorescence was utilized to observe the brain entry pathway of EXO labeled with PKH26. Following additional behavioral testing, ELISA assay was conducted to detect changes in monoamine neurotransmitters in the hippocampus. **Results:** After 72 h of intranasal administration of EXO, it reached brain regions such as the hippocampus. After 8 weeks of treatment, the improvement in depressive behavior in mice from the CMS+EXO group was statistically significant ($P<0.05$). Furthermore, statistically significant increases in the levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine, and norepinephrine in the hippocampus were observed ($P<0.01$). **Conclusion:** Intranasal

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82301632); 海南省科技厅社会发展项目(ZDYF2024SHFZ137, ZDYF2020145); 海南省热带环境脑科学研究与转化重点实验室开放项目基金(2022001); 海南医科大学研究生创新项目(HYYB2022A15)

[作者简介] 田梦思, E-mail: 13119683@qq.com。

[通讯作者] 易西南, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: YiXN001@163.com。

[收稿日期] 2024-08-17

[修回日期] 2024-11-03

网络出版时间: 2024-11-11 08:00:03

administration of ADMSCs-EXO can alleviate depressive behavior in mice and elevate monoamine neurotransmitter levels, suggesting that intranasal EXO may represent a novel therapeutic strategy for treating depression.

[Key words] Adipose-derived mesenchymal stem cells; Exosomes; Depression; Behavior; Mice; Monoamine neurotransmitters

重度抑郁障碍 (major depressive disorder, MDD) 作为全球范围内致残的主要原因, 其临床表现极具特征性, 不仅涉及诸如体力疲乏、体重减轻及食欲减退等生理症状, 还深刻影响患者的心理状态与日常功能。其中, 失眠作为 MDD 的一个标志性症状, 普遍存在于患者群体中, 同时, MDD 还伴随着动机缺失、睡眠障碍、认知功能障碍以及情感层面的内疚感等复杂情绪症状。这些综合表现共同构成了 MDD 的多维性挑战, 对个体生活质量造成严重影响^[1]。随着社会节奏加快与生活压力的增加, MDD 的发病率正呈现不断攀升的趋势。据世界卫生组织发布的最新数据, 从全球疾病负担视角来看, MDD 已跃居为全球第四大疾病负担源, 并预测至 2030 年, 其可能进一步攀升至首位, 成为全球最为沉重的疾病负担^[2,3]。关于 MDD 的治疗, 传统的给药方法包括口服药物、注射等, 但这些方法可能存在局限性, 如患者依从性、药物副作用、多数精神类药物无法到达血脑屏障等^[4]。因此, 探索无创给药方法成为了一个研究热点。无创给药方法, 如经颅磁刺激、经颅直流电刺激和鼻喷药物等, 具有操作简便、患者接受度高、副作用小等优点。在这些无创给药方法中, 鼻喷药物因其直接作用于大脑特定区域、起效快速且易于被患者接受而受到关注。鼻腔给药可绕过血脑屏障, 迅速将治疗药物从鼻黏膜经嗅束传递到脑^[5,6]。这种方法避免了口服药物可能带来的全身性副作用, 同时提高了药物的靶向性和生物利用度。

外泌体 (exosome, EXO) 是细胞外囊泡, 直径为 40~150 nm, 含有蛋白质、脂类、mRNA 和 microRNA (miRNA) 等多种生物活性物质^[7], 其中最重要的生物活性物质是核酸, 特别是非编码 RNA 如 miRNA^[8]。在大脑中, 它们参与突触可塑性、神经元应激反应、细胞间通讯和神经发生等过程。此外, 由于 EXO 可以穿过血脑屏障, 因此它们可以作为神经功能障碍的可用生物标志物^[9]。最新研究表明 EXO miRNA 通过参与 MDD 的下丘脑-垂体-肾上腺轴以及脑源性神经营养因子、免疫炎症反应、Wnt/ β -catenin 等信号通路的调节, 调控抑郁的发生发展, 显示其可能成为 MDD 诊断治疗的潜在生物活性物^[10]。本研究采用鼻腔吸入途径递送 EXO, 旨

在增强 EXO 对抑郁症的治疗效果, 进而为 EXO 经鼻给药作为抑郁症创新治疗策略的基础实验探索提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究选用 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 共计 24 只。鼠龄均为 8 周, 体重范围严格控制在 (24 ± 2) g 之间, 所有实验动物均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物使用许可编号为: HYLL-2023-026。实验动物的饲养环境严格遵循标准化条件, 维持室内温度于 23~25 °C 之间, 相对湿度保持在 50%~60% 的适宜范围内, 同时确保 12 h 光照与 12 h 黑暗交替的昼夜节律, 以保障动物的正常生理节律。实验期间, 小鼠享有自由饮水与摄食的权利。本研究严格遵循动物福利伦理原则, 所有实验操作均已获得海南医科大学实验动物福利伦理委员会的正式批准, 确保实验过程符合伦理标准。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要仪器: 自动多功能酶标仪 (Thermo Fisher BioTek-Epoch 2, 美国); 透射电镜 (日立 HT7800, 中国); 纳米颗粒跟踪分析仪 (Particle Metrix, 德国); 荧光显微镜 (型号: BX51+DP72, Olympus 日本); 冰冻切片机 (达科公司, 中国); 行为学实验系统 (淮北正华, 中国); 显影仪 (TANON 5200Multi, 中国)。

主要试剂: PKH26 (索莱宝, 中国北京); 胎牛血清 (BI, 澳洲); PBS、DMEM 低糖培养基、胶原酶、胰酶、4% 多聚甲醛、DAPI、BCA 试剂盒、山羊抗兔抗体 (BL003A) 等购自中国白鲨公司; 注射 10% 的水合氯醛来自海医生化教研室; OCT 包埋剂 (SAKURA, 日本); 抗体 CD19 (11-0199-42, Thermo Fisher Scientific)、CD105 (17-1057-42, Thermo Fisher Scientific)、CD44 (17-0441-82, Thermo Fisher Scientific) 和 CD11b (11-0118-42, Thermo Fisher Scientific); 抗体 Alix (67381-1-Ig, Proteintech)、TSG101 (67381-1-Ig, Proteintech)、CD63 (25682-1-AP, Proteintech); ELISA 试剂盒 [海马 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE)] 购自武汉科鹿生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组和造模 24只8周龄SPF级健康雄性C57BL/6J小鼠经适应性喂养2周后,随机分为对照组(PBS)、模型组(CMS)和实验组(EXO+CMS),每组8只,使用慢型束缚应激法^[11]建立抑郁模型,具体操作为在15 mL离心管的瓶身以及瓶底上钻出直径约2 cm的小孔,总共不少于18个,保证空气畅通,将小鼠头朝瓶底放入瓶子中盖上盖子,每天束缚时间为早上9时到下午5时,总共8 h,束缚期间断水断粮,连续束缚21 d后对小鼠进行行为学检测是否产生抑郁行为。正常组8只不进行束缚处理。

1.2.2 ADMSCs的分离培养 人脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs)来源于在无菌条件下从医院取得的健康女性抽脂手术的脂肪,取材后在无菌条件下静置30 min等待分层。分层后,取6 mL中间层脂肪组织置于15 mL EP管内,加入2 mL PBS, 2.5 mg I型胶原酶,设置恒温摇床120 r/min, 37℃,消化60 min,至组织成糜状。加入2 mL DMEM低糖培养基,该培养基含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素。设置1 200 r/min,离心10 min,弃上层液体,加适量培养基重悬底部沉淀。重复1次,用70 μ m滤器过滤。补充培养基至4 mL,转移到T25细胞培养瓶中,37℃,5% CO₂培养。培养24 h后细胞贴壁,换液,48 h传代至P1。本实验严格遵循人体组织科学研究伦理原则,所有操作均已获得海南医科大学伦理委员会的正式批准,项目编号为:HYLL-2023-026,确保实验过程符合伦理标准。

1.2.3 ADMSCs流式分选 取T25瓶P3代AD-MSCs,待密度长至80%,胰酶(BL512A, Biosharp)消化收集细胞。加2 mL培养基制备成细胞悬液,进行细胞计数,每管加入 5×10^4 个细胞。加入抗体CD19、CD105、CD44和CD11b,37℃孵育1 h后,用流式细胞仪检测细胞表面蛋白。

1.2.4 ADMSCs-EXO的提取及纯化 从AD-MSCs的培养上清液中提取EXO。在此过程中,首先用PBS洗涤ADMSCs 2次,加入无血清培养基,在37℃和5% CO₂下培养细胞72 h,收集上清液。EXO被通过超速超离法分离。首先,将样品依次以300、2 000、10 000 $\times g$ 的离心力各离心10 min以除去细胞碎片。然后,将上清液通过0.22 μ m过滤器后转移至超滤管中,以5 000 $\times g$, 4℃,离心30 min。取上层浓缩液转移到超离管中(100 000 $\times g$, 4℃, 70 min离心)。弃上清,所得沉淀由EXO组成,使用无菌PBS中稀释并储存在-80℃直至使用。

1.2.5 EXO的鉴定-NTA检测 采用纳米颗粒跟踪分析仪(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测EXO浓度及粒径大小,采用Zetaview对每个颗粒的布朗运动都将进行追踪及分析。

1.2.6 透射电镜鉴定EXO 将待测EXO溶液于12 000 r/min, 4℃, 10 min离心,取上清,然后将其配置成1:10 000的EXO稀释液,正滴覆盖铜网,将其置于烤灯下烤制半干。使用1%磷钨酸染色70 s。用滤纸吸取染液后,将铜网继续置于滤纸烤灯烤5 min。染色完毕,电镜观察检测,电压设置为60 kV。

1.2.7 免疫印迹分析(Western blot) 对小鼠实施麻醉后,以生理盐水进行灌注,随后摘取海马组织。组织经匀浆及裂解处理,利用高速离心机进行离心,以提取上清液。制备样品后,将蛋白质样品加载至SDS聚丙烯酰胺凝胶中,通过电泳实现分离,并电转移至NC膜上。接着,采用5%脱脂牛奶于室温条件下对NC膜进行2 h的封闭处理。之后,将NC膜浸入一抗稀释液中,于4℃环境下孵育过夜。次日,使用相应的二抗稀释液在室温下继续孵育2 h。最终,利用ECL超灵敏化学发光检测试剂盒,在全自动化学发光图像分析仪上完成显影。

1.2.8 PKH26标记ADMSCs-EXO 避光操作,用0.5 mL Diluent C重悬EXO,吹打混匀。5 μ L PKH26染色液加入0.5 mL Diluent C中混匀,再加入到EXO悬液中,立即吹打混匀。室温孵育5 min,间或吹打,加约9 mL无血清培养基终止染色,孵育1 min。100 000 $\times g$, 4℃离心70 min,弃上清,EXO重悬于3 mL无血清培养基,再次同条件离心。重复上一步离心后,重悬于3 mL无血清培养基,吹打去余色,再同条件离心。(可选步骤:再次离心去上清,视情况省略。最终用200 μ L PBS重悬EXO,储存于-80℃。)

1.2.9 EXO滴鼻 对正常小鼠连续3 d鼻腔滴入PKH-26荧光标记的EXO,最后1次滴入后1 h取小鼠脑组织进行切片。CMS+EXO组动物经双侧鼻孔滴入EXO液,每次2 μ L(含EXO 1×10^8 颗);PBS组动物滴入等量PBS。每天1次,1周连续给药5次,休息2 d,持续8周。

1.2.10 旷场实验(open-field test, OFT) 本研究采用特定设计的反应箱为实验装置,该箱体高度介于25~30 cm,底部边长为50 cm,内壁涂以白色以增强光线反射。箱体底面被均匀划分为25个小方格,以便于后续数据分析。在反应箱正上方约2 m处架设1台数码摄像头,其视野范围足以全面覆盖旷场内部,确保实验过程的全面记录。实验环境的光照

条件为全人工控制,允许研究者根据实验需求设定模拟的“白天”与“黑夜”时段,以探究光照变化对实验对象行为的影响。此外,实验室的背景噪音被严格控制在 65 dB 以下,以排除外界噪音对实验结果的潜在干扰。实验过程中,将待检测的小鼠逐一放入准备好的旷场设备中,随后启动录像设备,进行连续 5 min 的视频记录,观察各组小鼠的运动总距离、中央区探索距离和中央区探索时间。

1.2.11 悬尾实验(tail suspension test, TST) 通过医用胶带将小鼠的尾巴固定在铁架上,使小鼠处于倒挂悬空(约距离台面 15 cm)状态,小鼠悬挂 2 min 后记录 4 min 内的不动时间,一共悬挂 6 min。

1.2.12 强迫游泳实验(forced swim test, FST) 准备一个直径 20 cm 高 30 cm 的透明玻璃水槽,装 15 cm 高度的水,将水温控制在 25 ℃ 左右,将小鼠放入水中,记录小鼠入水 2 min 后的 4 min 内小鼠的不动时间,一共检测 6 min。检测完成后将小鼠从水中拿出,擦干小鼠身上的水,将水槽内的水换成新的自来水,再进行下一只检测。

1.2.13 喷糖实验 将实验小鼠放置于标准化旷场环境中,随后在其背部均匀喷洒浓度为 10% 的蔗糖溶液。随后,启动摄像设备,连续记录 5 min 内小鼠的行为表现。实验结束后,对记录进行细致分析,

统计小鼠在 5 min 内舔咬背部以清除蔗糖溶液的累计时间(舔背时间)。此指标被广泛用于评估小鼠的快感缺失症状,并同时观察其毛发梳理行为的变化,以综合反映小鼠的情感状态及可能的生理心理反应^[12]。

1.2.14 单胺类神经递质测定 所有行为学实验完成后,小鼠麻醉后取海马组织,破碎裂解后冰浴 30 min,于 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,检测 5-HT、DA、NE 的含量,使用 ELISA 试剂盒说明书的操作步骤进行。

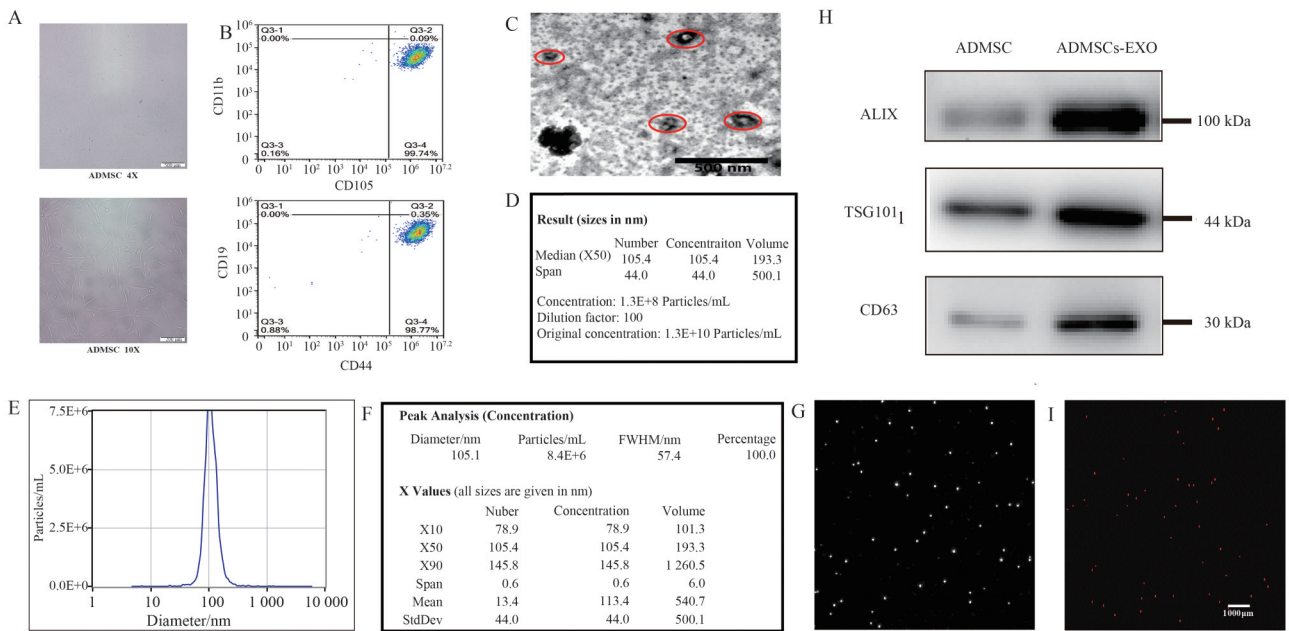
1.3 统计学处理

利用 Graphpad prism 8.0.2 软件,两组之间比较采用非配对 *t* 检验,多组之间比较均采用单因素方差分析。计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADMSCs-EXO 提纯及表征

如图 1A 所示,ADMSCs 呈梭形,鱼群状聚集排列,图 1B 流式细胞仪结果显示满足 CD105 阳性,CD11b 阴性的细胞为 99.74%。满足 CD19 阴性,CD44 阳性的细胞为 98.77%。符合脂肪干细胞一般形态。如图 1C~G 所示,提取并纯化的 ADMSCs,培养生长至 P5 代,利用超滤超离法获取



A: ADMSCs 显微镜下形态,比例尺=500 μ m/200 μ m;B:流式细胞的分选阳性率;C:透射电镜下的 Exo,图中红色圆圈所指为 Exo;比例尺=500 nm;D~G:Exo 的粒径分布、浓度测定及 Zeta 电位;H: Western blot 检测富集的 ADMSCs-Exo 标记蛋白;I:共聚焦显微镜下标记的 PKH26Exo;比例尺=1 000 μ m

图 1 ADMSCs 的培养、流式分选及 ADMSCs-Exo 的鉴定

Fig 1 Culture, flow sorting, and identification of ADMSCs-Exo

ADMSCs-EXO,并使用NAT和EM对EXO进行检测。EXO浓度为 1.3×10^{10} particle/mL,粒径中位数为105.4 nm,EXO在EM下呈脂质双层囊泡状结构,粒径均数在30~150 nm之间,符合EXO一般表征。图1H表示在相同的总蛋白水平下,与ADMSC相比,ADMSCs-EXO的标记物Alix、TSG101和CD63表达富集。图1I为PKH26-EXO经共聚焦显微镜(FV3000)观察下显示出EXO颗粒在溶液中进

行布朗运动。
2.2 小鼠通过鼻腔吸入标记的EXO成功入脑
对正常小鼠连续3 d鼻腔滴入PKH-26荧光标记的EXO,最后1次滴入后1 h,取小鼠脑组织进行切片,然后荧光显微镜下EXO在观察脑内分布情况。如图2所示:在小鼠脑水平切面上显示PKH26-EXO先后进入嗅球、梨状区、海马、顶额叶皮质等脑区。

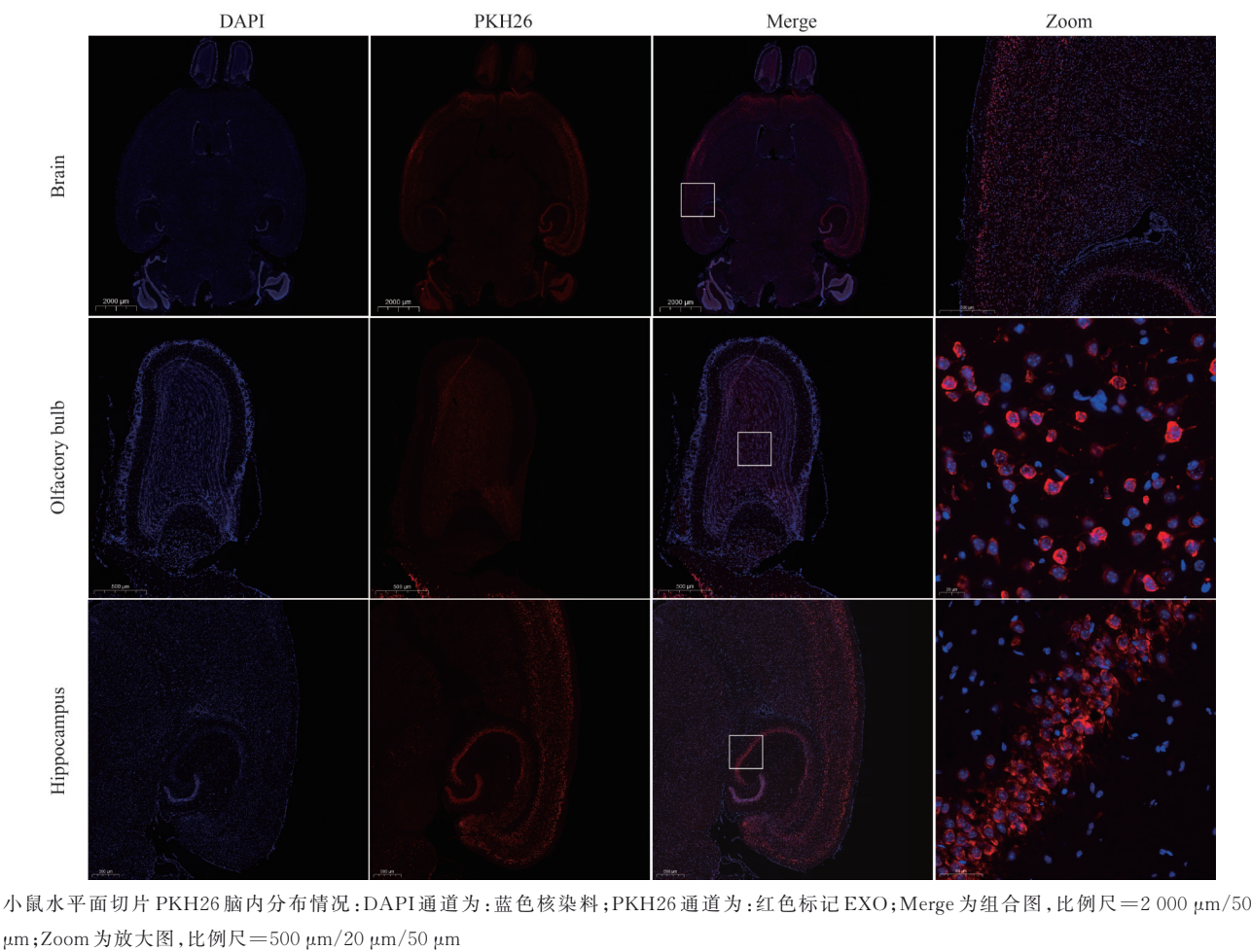
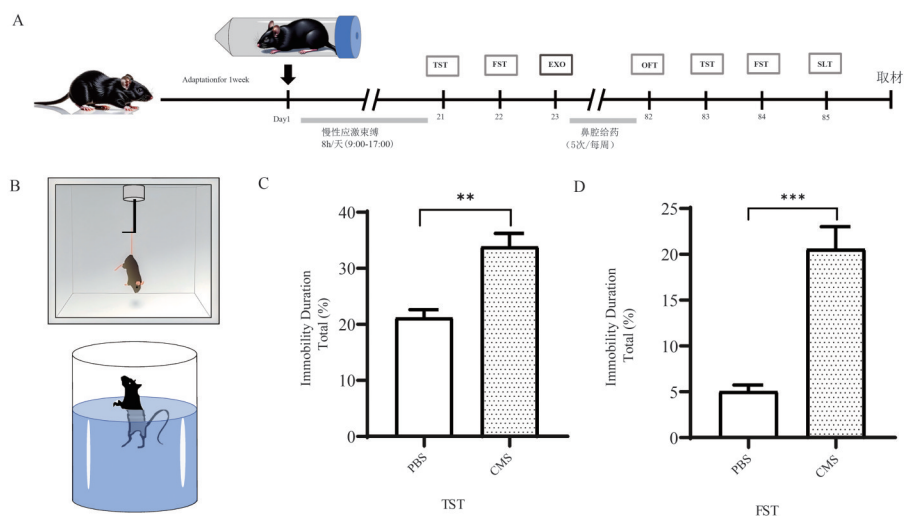


图2 标记EXO在各个脑区的表达
Fig 2 Marks of the expression of exosomes in various brain regions

2.3 小鼠抑郁样行为学比较
抑郁组小鼠在造模21 d后,TST、FST实验显示不动时间较PBS组显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。以上结果表明抑郁组小鼠出现明显抑郁样行为,见图3。
2.4 EXO滴鼻后各组小鼠抑郁样行为比较
EXO+CMS组小鼠经8周EXO治疗后,在OFT中展现出运动总距离、中央区总距离减少、中央区停留时间缩短;但与CMS组相比均有所增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。在TST与FST

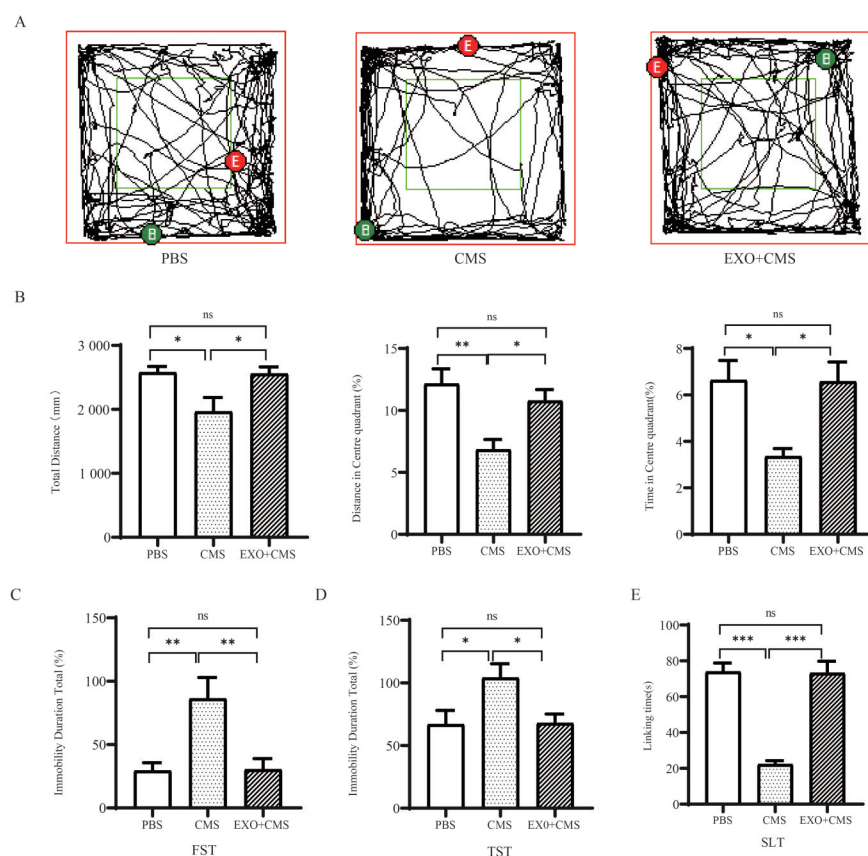
中,鼻腔EXO治疗组小鼠的不动时间相较于PBS组显著延长,但相较于CMS组则明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。此外,舔糖实验结果显示CMS组相比,鼻腔EXO治疗组小鼠的舔背时间明显延长,差异具有统计学意义($P<0.001$),进一步印证了鼻腔EXO治疗对抑郁组小鼠抑郁样行为的显著改善作用,见图4。
2.5 EXO治疗后各组小鼠海马单胺类神经递质含量比较
EXO+CMS组小鼠经鼻腔EXO治疗8周后,



A:抑郁小鼠造模及实验流程;B:小鼠悬尾、强迫游泳实验示意图;C:悬尾实验总静止时间对比;D:强迫游泳实验总静止时间对比;** $P<0.01$, *** $P<0.001$;PBS: $n=8$; CMS: $n=16$

图3 抑郁小鼠造模流程及小鼠抑郁样行为比较

Fig 3 Comparison of the modeling process and depression-like behavior of depressed mice



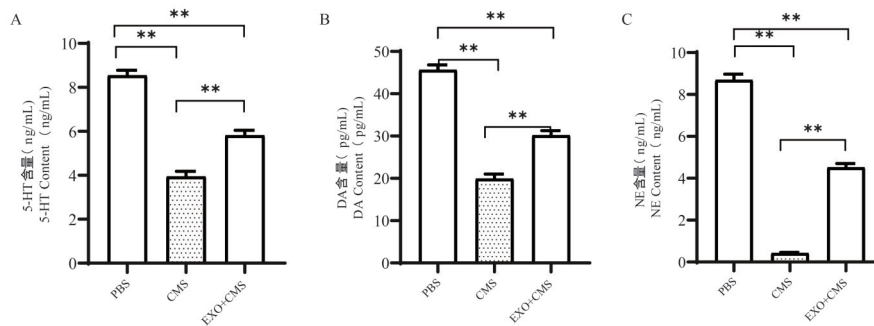
A:各组小鼠旷场实验示意图;B:各组小鼠旷场实验中总距离、中央区总距离与中央区总时间的对比;C:各组小鼠悬尾实验总静止时间对比;D:各组小鼠强迫游泳实验总静止时间对比;E:各组小鼠实验舔背时间对比;^{ns} $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, $n=8$

图4 EXO治疗后各组小鼠抑郁样行为比较

Fig 4 Comparison of depression-like behaviors of all groups of mice after EXO treatment

其海马区内的5-HT、DA、NE等单胺类神经递质含量相较于PBS组降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),但相较于CMS组则呈现显著增加趋势,且该

变化具有统计学意义($P<0.01$)。因此,可推断EXO鼻腔治疗能有效促进小鼠海马中单胺类神经递质的表达上调,见图5。



EXO 治疗后各组小鼠海马区内(A)5-HT、(B)DA、(C)NE 含量比较, ** $P < 0.01$, $n = 8$

图5 各组小鼠海马单胺类神经递质含量比较

Fig 5 Comparison of monoamine neurotransmitters in the hippocampus of each group

3 讨论

脂肪组织作为活跃的内分泌器官,富含 AD-
MSCs,后者在软组织损伤修复中扮演关键角色^[13,14]。相较于其他间充质干细胞来源,ADMSCs 具有易获取、数量充足及显著的组织修复与再生功能,被国际脂肪治疗学及科学联合会认定为再生疗法的潜在宝贵资源^[15]。鉴于此,ADMSCs 在临床应用中备受期待,承载着重要的治疗希望^[16]。本研究采用高效的胶原消化法体外分离 ADMSCs,依据 ISCT 标准^[17],通过流式细胞术检测确认其表面标志物特征:CD44⁺、CD105⁺高表达,CD11b⁻、CD19⁻低表达,符合 ADMSCs 特性。细胞形态呈梭形、鱼群状排列^[18],生长模式稳定,验证了 ADMSCs 的成功分离与培养,方法简便有效。EXO 为纳米级小细胞外囊泡,由磷脂双分子层构成,尺寸介于 30~200 nm 之间,亦称脂质囊泡,源自核内体陷,作为细胞间通讯媒介,携带遗传物质及生物活性分子^[17]。研究显示,ADMSCs 主要通过免疫调节与旁分泌机制(尤其是 EXO)而非直接分化发挥功能。当前,EXO 提取技术多样,超速离心法被视为“金标准”^[19]。本研究创新性地融合超滤与超离心技术,高效提取高浓度、高纯度 ADMSCs-EXO。超滤初步富集 EXO,去除大颗粒杂质;超离心进一步纯化,分离不同颗粒,确保 EXO 纯度。此方法简便、重现性好、样本损伤小,为后续研究提供高质量样本。采用 NTA、透射电子显微镜等技术验证^[20],确认提取物 EXO 特性,包括颗粒数、形态及脂质双分子层结构,满足研究需求。

研究表明,EXO 参与并影响抑郁症的发生、发展等过程。鼻腔给药作为一种微创、易于重复且操作简单的方法,能够通过单个上皮细胞层直接将药物运输到全身血液循环,或沿嗅觉神经细胞直接穿过血脑屏障进入大脑^[21]。而相关研究发现通过尾

静脉注射的 EXO 大部分到达了肝脏、肾脏等体内外周器官,进入大脑的 EXO 量相对较少^[22-24]。本研究发现,标记后的 ADMSCs-EXO 在经鼻给药后能够迅速且有效地进入大脑,并显著改善了小鼠的抑郁样行为,这可能与 EXO 的血脑屏障穿透能力、神经保护与修复作用、免疫调节与抗炎作用、调节神经递质和受体以及直接作用于大脑特定区域等多种机制有关。鼻腔给药能够直接将 EXO 传递至大脑,这一途径通过 EXO 携带的神经营养因子、生长因子等关键分子,有效促进神经元的存活、再生及突触功能的恢复^[25]。同时,EXO 还能减少炎症反应,清除有害物质或调节神经递质,从而显著改善抑郁小鼠的行为和认知功能。此外,ADMSCs-EXO 展现出免疫调节或免疫抑制的潜力,这对于抑郁的治疗同样具有重要意义。在抑郁的发病过程中,免疫系统的过度激活和炎症反应是加剧神经元功能异常和情绪障碍的关键因素之一^[26]。EXO 可能通过调节免疫细胞的活性、抑制炎症介质的释放、促进抗炎分子的表达以及影响 5-HT 能系统等多种途径,共同作用于减轻炎症反应对神经元的损害,进而缓解抑郁症状并改善疾病进程^[27]。

在抑郁样行为学实验中,本课题组观察到抑郁组小鼠在 TST 和 FST 实验中不动时间的显著增加,则表明抑郁组小鼠出现了典型的抑郁样行为。而经过 8 周的鼻腔 EXO 治疗后,EXO+CMS 组小鼠在 OFT 中的表现有所改善,TST 与 FST 中的不动时间显著减少,喷糖实验中舔背时间也明显延长,则表明 EXO 治疗有效缓解了小鼠的抑郁样症状。进一步分析 EXO 改善抑郁小鼠行为的潜在机制,我们推测这可能与 EXO 的多重生物活性密切相关。首先,EXO 能够调节免疫细胞的活性,抑制促炎因子的释放,同时促进抗炎分子的表达,从而减轻神经系统的炎症反应,保护神经元免受损害^[28]。

其次,EXO可能通过携带并传递特定的神经生长因子或神经营养因子,促进受损神经元的修复与再生,恢复正常的神经传递功能^[29]。此外,EXO还可能影响脑内单胺类神经递质(如5-HT)的代谢与平衡,调节情绪相关的神经环路,从而改善抑郁症状^[30]。这一发现不仅验证了EXO在抑郁模型中的治疗效果,也为后续机制研究提供了有力的实验依据。

最后,本课题组检测了EXO治疗对小鼠海马区单胺类神经递质的影响。结果显示,EXO+CMS组小鼠海马中的5-HT、DA和NE含量相较于PBS组虽有所降低,但较CMS组则显著增加。这一变化为笔者理解EXO在抑郁症治疗中的潜在作用提供了新的视角。首先,从单胺类神经递质的角度来看,5-HT、DA和NE等单胺类递质在情绪调节、认知功能及行为反应中发挥着关键作用。抑郁症患者常伴有这些神经递质的代谢异常,表现为递质水平下降或功能失衡^[31]。本研究中,EXO+CMS组小鼠海马区5-HT、DA和NE含量的显著增加,提示EXO治疗可能通过调节这些神经递质的代谢与平衡,从而改善抑郁症状。这一结果与当前神经科学领域关于抑郁症发病机制及抗抑郁药物治疗机制的研究相一致。进一步地,笔者推测EXO对抑郁症的潜在治疗作用可能与其免疫活性及抗炎作用密切相关。近年来,越来越多的研究表明,免疫系统的过度激活和炎症反应在抑郁症的发病过程中扮演着重要角色^[26]。EXO作为细胞间通讯的重要媒介,不仅参与神经递质的传递与调节,还可能通过携带抗炎因子、调节免疫细胞活性等方式,抑制神经系统的炎症反应,从而减轻神经元损伤,促进神经元的修复与再生。这一抗炎作用可能间接地促进神经递质的合成与释放,进一步改善抑郁症状^[27]。然而,本研究仅初步探讨了EXO滴鼻对抑郁小鼠行为的影响及单胺类神经递质水平的改变观察,并未深入探究其具体的分子机制及信号通路。未来的研究需进一步阐明EXO如何调节神经递质的代谢与平衡,以及其在抑郁症治疗中的具体作用机制,以期在抑郁症治疗的临床应用提供更为坚实的理论基础和实验依据。

综上,本研究不仅证实了ADMSCs-EXO经鼻腔途径给药在缓解小鼠抑郁样行为中的有效性,还初步揭示了其可能通过改善免疫和炎症过程,促进单胺类递质的合成和释放,从而成为抑郁症治疗中的一种新型有效手段。未来研究将进一步深入探讨EXO的具体作用靶点及其分子机制,以期在抑郁

症等中枢神经系统疾病的治疗提供新的思路与策略。

作者贡献度说明:

易西南:提出课题思路并提供指导;田梦思:进行相关实验、数据分析并进行文章书写;郑育杰、沈雅婷:进行实验协助并记录实验数据;郭青云:进行图片排布及修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 Cui L, Li S, Wang S, et al. Major depressive disorder: Hypothesis, mechanism, prevention and treatment [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 30.
- 2 Nagy C, Maitra M, Tanti A, et al. Single-nucleus transcriptomics of the prefrontal cortex in major depressive disorder implicates oligodendrocyte precursor cells and excitatory neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (6) : 771-781.
- 3 Weavers B, Riglin L, Martin J, et al. Characterising depression trajectories in young people at high familial risk of depression [J]. *J Affect Disord*, 2023, 337: 66-74.
- 4 MacQueen G, Santaguida P, Keshavarz H, et al. Systematic review of clinical practice guidelines for failed antidepressant treatment response in major depressive disorder, dysthymia, and subthreshold depression in adults [J]. *Can J Psychiatry*, 2017, 62(1): 11-23.
- 5 杨丽, 侯曙光, 周璇. 鼻腔给药在神经系统疾病治疗中的研究进展 [J]. *中国现代应用药理学*, 2023, 40(20): 2865-2871.
- 6 Yang L, Hou S, Zhou X. Research progress of intranasal drug delivery system for treatment of central nervous system diseases [J]. *Chin J Modern App Pharm*, 2023, 40(20): 2865-2871.
- 7 廖萍, 曹萌, 张景辰, 等. 经鼻给药的机遇与挑战 [J]. *中国现代应用药理学*, 2023, 40(20): 2761-2765.
- 8 Liao P, Cao M, Zhang J, et al. Opportunities and challenges of nasal drug delivery [J]. *Chin J Modern App Pharm*, 2023, 40(20): 2761-2765.
- 9 Kaltenboeck A, Harmer C. The neuroscience of depressive disorders: A brief review of the past and some considerations about the future [J]. *Brain Neurosci Adv*, 2018, 2: 2398212818799269.
- 10 Xu R, Zhang F, Chai R, et al. Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7617-7631.
- 11 Saeedi S, Israel S, Nagy C, et al. The emerging role of exosomes in mental disorders [J]. *Transl Psychiatry*, 2019, 9: 122.

- 10 柴玉慧, 蔡雅文, 缪明星, 等. 外泌体 miRNAs 在抑郁症中的作用及作为其生物标志物的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(16): 1466-1470.
Chai Y, Cai Y, Miao M, et al. The role of exosomal miRNAs in depression and progress in research on it as biomarker[J]. Chin J New Drugs, 2021, 30(16): 1466-1470.
- 11 Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage[J]. Neurobiol Stress, 2016, 6: 78-93.
- 12 Zhong X, Cao W, Zhao H, et al. MicroRNA-32-5p knockout eliminates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice through inhibition of astrocyte overactivity[J]. Brain Behav Immun, 2020, 84: 10-22.
- 13 Auger C, Kajimura S. Adipose tissue remodeling in pathophysiology [J]. Annu Rev Pathol, 2023, 18: 71-93.
- 14 Sumarwoto T, Suroto H, Mahyudin F, et al. Role of adipose mesenchymal stem cells and secretome in peripheral nerve regeneration [J]. Ann Med Surg (Lond), 2021, 67: 102482.
- 15 Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [J]. Cytotherapy, 2013, 15(6): 641-648.
- 16 Fang Y, Zhang Y, Zhou J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes: A novel pathway for tissues repair [J]. Cell Tissue Bank, 2019, 20 (2): 153-161.
- 17 van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(12): 2596-2607.
- 18 韩杰, 葛安, 马晓霞, 等. 外泌体提取及保存技术研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(2): 451-459.
Han J, Ge A, Ma X, et al. Research progress on the isolation and preservation techniques of exosomes [J]. Chin J Cell Biol, 2021, 43(2): 451-459.
- 19 Mita T, Furukawa-Hibi Y, Takeuchi H, et al. Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Behav Brain Res, 2015, 293: 189-197.
- 20 Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, et al. Corrigendum to "Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy" [Journal of Controlled Release 207, (2015) 18-30] [J]. J Control Release, 2021, 339: 232-234.
- 21 Riazifar M, Mohammadi MR, Pone EJ, et al. Stem cell-derived exosomes as nanotherapeutics for autoimmune and neurodegenerative disorders [J]. ACS Nano, 2019, 13(6): 6670-6688.
- 22 Wen S, Dooner M, Papa E, et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a radiation injury bone marrow murine model [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(21): 5468.
- 23 Alegre E, Zubiri L, Perez-Gracia J, et al. Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers [J]. Clin Chim Acta, 2016, 454: 28-32.
- 24 Xie L, Chen J, Ding Y, et al. MicroRNA-26a-2 maintains stress resiliency and antidepressant efficacy by targeting the serotonergic autoreceptor HTR1A [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 511(2): 440-446.
- 25 荣婧彤, 孙思琦, 刘忠纯. 外泌体在抑郁症中研究进展 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2023, 49(4): 247-250.
Rong J, Sun S, Liu Z. Research progress of exosomes in depression [J]. Chin J Nerv Mental Dis, 2023, 49(4): 247-250.
- 26 Nazari S, Pourmand SM, Motevaseli E, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) and MSC-derived exosomes in animal models of central nervous system diseases: Targeting the NLRP3 inflammasome [J]. IUBMB life, 2023, 75(10): 794-810.
- 27 陈华琴, 王谨敏. 外泌体 microRNA 在抑郁症中的研究进展及应用前景 [J]. 中国现代医药杂志, 2023, 25(4): 95-99.
Chen H, Wang J. Research progress and application prospects of exosomal microRNAs in depression [J]. Modern Med J Chin, 2023, 25(4): 95-99.
- 28 Dalvi P, Sun B, Tang N, et al. Immune activated monocyte exosomes alter microRNAs in brain endothelial cells and initiate an inflammatory response through the TLR4/MyD88 pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9954.
- 29 Bátiz LF, Castro MA, Burgos PV, et al. Exosomes as novel regulators of adult neurogenic niches [J]. Front Cell Neurosci, 2016, 9: 501.
- 30 Boku S, Nakagawa S, Toda H, et al. Neural basis of major depression: Beyond monoamine hypothesis [J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2017, 72(1): 3-12.
- 31 王元翀, 邱喜龙, 王博瑶. 中药调控单胺类神经递质治疗抑郁症的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(9): 2182-2196.
Wang Y, Qiu X, Wang B. Research progress in treatment of depression with traditional Chinese medicine by regulating monoamine neurotransmitters [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(9): 2182-2196.

[本文编辑] 雷燕 宋睿璞 陈思润